

公表特許公報(A)

平1-503275

Int. Cl. ⁴	発明の名称	特許庁登録番号	審査請求	出願	出願	出願	出願
C 12 N 15/00	酵母ベクター	8717-4B	未請求	昭和63年(1988)11月9日	昭和63年(1988)11月9日	昭和63年(1988)11月9日	昭和63年(1988)11月9日
1/16		K-7421-4B	未請求				
C 12 P 21/00		C-6712-4B	未請求				
							(全 14 頁)

発明の名称 酵母ベクター

特許 昭63-50234

出願 昭63(1988) 4月8日

特許文提出日 昭63(1988)12月8日

出願 昭63(1988) 4月8日

国際公開番号 WO88/08027

国際公開日 昭63(1988)10月20日

優先権主張 昭和62年4月9日イギリス(G B)特許6708455

発明者 ヒンクリフエ、エドワード イギリス国 ノッティンガムシャー、パートン ジョーエル、ラムブ

出願人 デルタ バイオテクノロジー イギリス国 エヌダウ 1 エフディー、ノッティンガム、カース

代理人 奔野士 浅村 皓 外3名 ル プールバード、カースル コート (普通地なし)

指定国 A T(広域特許)、A U、B E(広域特許)、B R、C H(広域特許)、D E(広域特許)、D K、F I、F R(広域特許)、G B、G B(広域特許)、H U、I T(広域特許)、J P、K R、L U(広域特許)、N L(広域特許)、S E(広域特許)

最終頁に続く

要 約

1. 酵母菌によって受け入れられるDNA配列、その1対が同じ方向性を有し他の2対が逆の方向性を有する3個の2 kb P L P 複製元部位、及び目的とする遺伝子又はペプチドをコードするDNA配列を含むベクターであつて、上記複製元部位によって受け入れられるDNA配列が上記同じ方向性を有する1対の2 kb P L P 複製元部位の間にある2 kb プラスミドベクター。

2. 選択マーカーDNA配列を含む複製元の親複製1項配列の2 kb プラスミドベクター。

3. (i) ベクターリプラスミド中のベクターの複製に必要なベクターリプラスミドDNA配列; (ii) エキストラ2 kb P L P 複製元部位; (iii) 目的とする遺伝子又はペプチドをコードするDNA配列; 及び細胞培養用培養用の選択マーカーDNA配列を保持する複製2 kb プラスミドであつて、2 kb プラスミドの2つの異なる複製元部位の1つの配列内の複製基配列に上記ベクターリプラスミドDNAが存在し且つ上記エキストラ P L P 複製元部位が作図されてあり、上記エキストラ P L P 複製元部位は上記逆方向複製配列の1つの配列内の内因性 P L P 複製元部位に代りて同じ方向性を有しており、上記ベクターリプラスミドDNA配列はエキストラ P L P 複製元部位と上記逆方向複製配列の1つの配列内の内因性 P L P 複製元部位との間に存在する2 kb プラスミドを含む複製

元の親複製2項配列の2 kb プラスミドベクター。

4. 上記制限酵素部位がエヌダウ Xba I 部位である複製元の複製基配列の2 kb プラスミドベクター。

5. 全てのベクターDNA配列が上記のようにベクター P L P 複製元部位と内因性 P L P 複製元部位との間にある複製元の複製基配列は有4項配列の2 kb プラスミドベクター。

6. 目的とする遺伝子又はペプチドをコードするDNA配列が選択マーカーである複製元の複製基1項から5項のうちのいずれか1項配列の2 kb プラスミドベクター。

7. 目的とする遺伝子又はペプチドをコードするDNA配列が、H S A をコードするDNA配列であつて、該DNA配列はその5'末端が酵母菌において複製するプライマー配列を介して酵母菌において複製する遺伝子プロモーターと融合しており、その5'末端が酵母菌において複製する酵母菌マーカーネーションシグナルに結合している酵母菌の複製基6項配列の2 kb プラスミドベクター。

8. 目的とする遺伝子又はペプチドをコードするDNA配列が、その5'末端が G A L / C Y C 1 G A L / P O X ハイブリッドプロモーターと融合しておりその5'末端が酵母菌において複製する酵母菌マーカーネーションシグナルに結合している G E T - H S A 遺伝子である酵母菌の複製基6項配列の2 kb プラスミドベクター。

9. 目的とする遺伝質又はペプチドをコードする遺伝子が、DXX-遺伝子、あるいは、その遺伝子が酵母において発現する分裂期1期配列を介して酵母において発現する遺伝子プロモーターに融合してありその遺伝子が酵母において発現する転写因子キナーゼリンシグナル伝達融合している *Eno113s subunit* のプロモーターをコードする DNA 配列である酵母の細胞系15のから5項のいずれか1項配列の2nd プラスミドベクター。

10. 操作した酵母細胞のpSAC5の配置を突発的に有する酵母の細胞系1項配列の2nd プラスミドベクター。

11. 酵母の細胞系1項から5項のいずれか1項配列の2nd プラスミドベクターの製造法であつて、(i)酵母形質転換法を適用するための DNA 配列；(ii)目的とする遺伝質又はペプチドをコードする DNA 配列；及び (iii) ペプチドアミンでペプチドの増強を可能にするペプチドプラスミド DNA と (iv) FLN 阻害剤配列のエレメントを含む挿入用 DNA 配列を、ユカスト YALP 細胞系15の細胞系1項から5項のいずれか1項配列の2nd プラスミドベクターに導入することを含む上記の製造法。

12. 上記挿入用 DNA 配列を内細胞 FLN 阻害剤配列のエレメント2%1配位に挿入し、挿入用 DNA 配列の一

方の末端に2nd プラスミドの複製配列の1項を有し、他方の末端に2nd プラスミドの反複製配列の1項の配列を有する酵母の細胞系1項配列の製造法。

13. 酵母に対して酵母の遺伝質又はペプチドをコードする DNA 配列を含む、ペプチド DNA は含まない2nd プラスミドベクター。

14. 酵母の細胞系1項から5項のいずれか1項又は5項1項配列の2nd プラスミドベクターで形質転換された酵母の細胞系又は細胞系1項。

15. 酵母の細胞系1項配列の酵母を発現することによって得られる酵母とする遺伝質又はペプチド。

16. 目的とする遺伝子が2nd 1項配位を突発的に又は発現的に導入されている2nd プラスミドベクター。

明 細 書

発 明 の 概 要

本発明は、酵母、特に *Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子工学に関する。

形質転換と書かれる工程によつて、異種 DNA が酵母細胞に導入され、次いで複製的に継承されて該 DNA の発現が行われる。形質転換についての最初の報告は 1970 年代の後半に行われ、その時の形質転換は、酵母の細胞壁を酵素の作用によつて除いてプロトプラストを得、これに DNA を加える方法を用いるものであつた (Hiscoe et al., 1977; Beggs, 1978)。最近ではインダクト酵母細胞を用いた形質転換が証明されている (Hiscoe et al., 1978)。

酵母は適合プラスミドを用いて形質転換することができる、この目的のために通常、"シタトルベクター"として調整されたプラスミドが使用されており、このシタトルベクターは *Escherichia coli* あるいは酵母のいずれにおいても発現することができる (Hiscoe et al., 1977; Beggs, 1978; Strubel et al., 1979)。

pSAC 22 (Bolliver, 1978) などの *E. coli* プラスミド DNA 配列が *E. coli* 中に取込まれることによつて、*E. coli* 中のベクター DNA の量が低減され、そ

の複製速度の形質転換を助長し得ることができ。

酵母形質転換に一般的に使用されているプラスミドベクターは次の2つに大別される。即ち、(i) DNA 複製オリジンを有しているため、クロモソーム DNA に依存することなく自己を複製することが出来る複製ベクター；及び(ii)クロモソーム DNA と融合を醸成し、宿主細胞中の複製 DNA として複製し自己を維持するモノクローニカルベクターの2つである。複製ベクターは異種、(iii)酵母の同種2nd プラスミドから得られる DNA 複製オリジンを含む2nd 由来プラスミドベクター；(iv)酵母のクロモソーム DNA から得られる見掛けの複製オリジンを自己複製ベクター；及び(v)上記の DNA 複製オリジンの1つと更にセントロメアを含むことが知られている酵母クロモソーム DNA 配列を有するセントロメアプラスミド (CEM) に分けられる。

上記したベクターで有効に酵母を形質転換するためには、複製 DNA を保持する形質転換を同様に選択することが必要である。この選択は、ベクター-DNA 内阻抑制可能な選択剤を有する遺伝子を導入することによつて達成される。実験室で酵母を形質転換するのに使用するベクターの場合には、LSM 2、URA 5、TRP 1 (Hiscoe et al., 1977; Beggs, 1978; Gerbaud et al., 1979) などの原核型遺伝子が通常使用され、これらは酵母の栄養要求性における欠陥を補償するように作用する。しかしながら、真酵母

酵素及び他の工用用途に用いられる酵素活性はしばしば宿主細胞であるため宿主細胞に由来する。従って強力な選択性遺伝子に基づいた選択性を利用することが必要である。この点に関連して、宿主の遺伝を複製する遺伝子を保持した2 μ m複製型プラスミドベクターが報告されている。即ち、Higuchi et al., 1980; Hester et al., 1983; ハイダロマン (Hidamann) et al., 1983; プラウマン (Plautman) et al., 1980; Hoffeld et al., 1984) などの宿主細胞に対して、及び御藤 (Mitsunaga) et al., 1983; Wilson et al., 1985; キョウバタ (Kyo-bata) et al., 1983; 堀 (Hori) et al., 1985) などの宿主細胞に対して宿主を認識する遺伝子を用いた例がある。

理由中で複製し遺伝子が宿主に継承されるべき場合、形質転換に用いた酵素ベクターのタイプに依っている。前述した2つのタイプのベクターのうちで複製型ベクターはインテグレートベクターである。酵素のインテグレート形質転換の原理及び酵素については文献 (Botstein & Davis, 1982; Wilson et al., 1985; Orr & Weaver et al., 1983; Botstein, 1985) に記載されている。一般的にインテグレート形質転換は比較的高い効率で低く、閉鎖型インテグレートプラスミドの場合にはDNA 1 μ g当たり約1-10個の形質転換体が得られることが報告されている。

プラスミドは細胞に侵入し、2コピーの割合で存在し (Clark & Carbon, 1980; Fagan, 1981; 1世代当たりおおよそ1個が失われる) である (Wardley et al., 1983)。4.4 μ m 2 μ m 複製型プラスミドは、宿主の複製及びプラスミド中に存在する2 μ m DNA 配列に依って宿主の低度の遺伝的安定性を示す。

2 μ m プラスミドは細胞の壁に存在していることが知られている (Holmes & Paquay, 1979; Livingston & Heine, 1979; Gellay et al., 1980; Takeo et al., 1980; Sigurdson et al., 1981) が、メンデルの法則のように伝達されない (Livingston, 1977)。2 μ m プラスミドを所定ない細胞 (cell) が、細胞1当たり2 μ m プラスミドの平均コピー数が50である半数体細胞集団から1世代当たり0.01-0.01%の割合で消失することが示されている (Futcher & Cox, 1983)。このような低レベルの遺伝的不安定性の原因を説明するものとして、2 μ m プラスミドは通常の複製条件下で細胞に別して何らかの損傷を有していることが明らかになる (Bronch, 1981; Futcher & Cox, 1983; Sigurdson et al., 1981)。しかしながら、2 μ m プラスミドを有している細胞について2 μ m プラスミドが低頻度に対しておおよそ等しい結果を及ぼしていることが報告されている (Wardley et al., 1983; J. corevicius の遺伝的転移を分析した所、無差別の

(Mooney et al., 1979; Hicks et al., 1979) したことが、複製型プラスミド DNA と有関係性を有するフリー-複製を持つ複製 DNA は低い頻度 (10⁻⁶-10⁻⁷) で酵素を形質転換し、形質転換に際した DNA は一般に複製型に対して相同性を有する細胞中に転送される (Orr & Weaver et al., 1983)。従って、通常の形質転換法を用いてベクター DNA を複製することによって、形質転換の効率を高く、プラスミドのインテグレート形質を認めることが可能である。形質転換の効率が十分に高く、かつプラスミド内に転送されるベクター DNA 配列が、複製型細胞に転送される遺伝子内に転送されない場合には、無差別の遺伝的遺伝子のマテリアライゼーションにインテグレート形質転換を用いることができる。最近、無差別の遺伝的遺伝子のインテグレート型ベクターについて報告されている (Yoon, 1985)。

インテグレートベクターは選択を受けずに宿主の低頻度に変異に転送されるが、複製ベクターはこれとは違って不変性である。遺伝的に継承される複製型は用いる複製ベクターのタイプに依る。APR プラスミドは高コピー数で存在し (細胞1個当たり約20-50コピー)、より安定した傾向にあるが、1世代当たり約10%以上の頻度で失われる (Ruvolo, 1983)。しかしながら、APR プラスミドの複製型はセントロメアが結合することによって上昇する。セントロメア

(Tubb, 1980; Asple et al., 1984; Hinchliffe & Deuney, 1984) などの酵素の塩とんどの間に2 μ m プラスミドが存在していたことが報告されている (Clark & Walker & McKillop, 1974)。従って、2 μ m プラスミドは宿主に存在しており、このことが本質的に高頻度の遺伝的安定性を有していることを示していると考えられている。

2 μ m プラスミドについての複製分析及び分子分析の結果、2 μ m プラスミドの複製及び安定性に関して多くの情報が得られている (Volpert & Broach, 1987)。本質的にはこのプラスミドは3-18塩基対の環状 DNA 分子からなっている (Rattley & Donelson, 1980)。そしてこのプラスミドはミニマムに二方向性の DNA 複製オリゴンを有しており (Newman et al., 1981)。これがすべての2 μ m 複製ベクターの必要成分となっている。2 μ m プラスミドは3つの遺伝子、即ち REP 1, REP 2, REP 3 及び FLP を含んでおり、これらが細胞1個当たりのコピー数を高く複製に維持するために必要とされている。REP 1 と REP 2 遺伝子はトランス作用蛋白質をコードしており、この蛋白質は、REP 3 遺伝子と相互作用して細胞内で複製を促進し、細胞分裂の際に2 μ m プラスミドの分離が安定に行われるのを可能ならしめていると考えられている (Volpert & Broach, 1987)。この点に関して、REP 3 遺伝子は、2 μ m プラスミド

の安定な分子を行なうシス作用遺伝子として作用しており、 ρ 因子プロモントロムと染色の複製型を有している (Jagert et al., 1985; Kikuchi, 1985)。2 *am* プラスミドの複製形態は、2つの逆方向反復 DNA 配列 (それぞれ5'末端側) が存在することであり、この配列によって複製分子が2つのミニター領域に分離されている。逆方向反復 DNA 配列の間で分子内組換えが起こり、一方のミニター領域が他のミニター領域に対して逆方向となり、A及びBと置かれる遺伝子の複製単位が生じて *in vivo* で2つの複製体を持つ複合集団が産生される (Boige, 1978)。2つの逆方向反復配列間での組換えは、PLPと置かれる遺伝子の複製単位によって媒介され、PLP 遺伝子が逆方向反復領域内での高頻度の組換えを介することができる。この組換え頻度の結果として、プラスミドローターの増殖が観察されていると述べられている (Futcher, 1986; Vozzelli & Broach, 1986; Sog et al., 1986; Murray et al., 1987)。

それぞれの逆方向反復配列は、5つの DNA 反復配列サブユニット (異なる配列に形成されている) を含んでおり、そのうちの2つのサブユニットは互いに同じ方向性を有しており、他の3つのサブユニットは逆方向であつて互に逆方向結合はミニター領域を介して他の2つのサブユニットのうちの1つに結合し

ている。このミニター領域はミニター Xca I 部位を有しており、PLP 遺伝子の複製開始を駆動させてその生成物によってその領域が切斷される。それに際しては、他の逆方向反復配列に対してそれらに際して相同性を有してあり、切つて末端が切斷された後に正確に組換えが行なわれる。Anderson 氏によつて、8 *bp*、ミニター領域を含む74塩基対の配列が PLP 遺伝子典型的な転写元は最低限必須であることが見出された (Anderson et al., 1985)。

2 *am* プラスミドの複製型に基づいた動物ベクターは、2 *am* プラスミドの複製に必須ではない領域に反復 DNA 配列を挿入することによって構築される (Beers, 1981)。このようなベクターには基本的な2つのタイプがある。即ち、(i) 全2 *am* ベクター及び(ii) オリジンベクターである。前者の場合には、2 *am* ベクターの全てを有してあり、さらに *ori*, *col* プラスミド DNA などの各種の複製配列が挿入されている。このように挿入されたプラスミドは、*ori*⁺ (2 *am* 全挿) 及び *Col*⁺ (2 *am* 欠損) 両方のいずれにおいても、高い複製的安定性を有しており高いコピー数で維持される。他方後者の2 *am* オリジンベクターは、通常、2 *am* の DNA 複製オリジンと2 *am* の5'9'末端側反復配列のシグナルローターを有する最小 DNA 配列を持つのみであつて、このようなベクターは *Col*⁺ 型で維持でき、維持できない。同様に、安定に維持されるために、

これらのベクターは、特異的なプラスミドの REP 1 及び REP 2 遺伝子によってコードされる蛋白質をトランス作用蛋白質として用いる必要があるためである。

複製遺伝子を発現して高頻度に複製を繰り返すベクターを高レベルで維持することのできる遺伝子の修正された複製を構築する場合に、通常、高コピー数のサブベクターを選択することが望ましい。2 *am* 由来ベクターは複製プラスミドとして用いるには非常に好適であることが認められており、今日ではしばしば2 *am* 由来ベクターが用いられている (Kagman et al., 1985)。

陰性選択法 (第563050537, 1 (公開番号 020125941, 1) 出願人ゲルマニオオパナソニック) には、最初のビーム照射時には複製遺伝子の発現が起こらず、動物の量が重複される低ビームから動物を取り出すと複製蛋白質の合成が誘導されるように、工業用動物を遺伝学的に修正して複製用動物中で複製蛋白質を産生する方法が記載されている。かかる方法は、強力な選択マーカー CDP-1 と修正した血清蛋白質 II-1 ドメチルアラニン (Met-HSA) をコードする遺伝子とを有する2 *am* 由来ベクターであつて複製蛋白質の発現がゲラチン-1 誘導プロモーターによって高レベルで誘導されているベクターで、複製用動物を形成動物することによって達成される。上記の方法の複製期間中、複製蛋白質の合成量を

最大にするためには次のことを構築するが必要である。即ち、(i) 誘導される遺伝子 (Met-HSA をコードする) の高コピー数; (ii) 肝臓での高複製条件下において目的とする遺伝子の複製的安定性の高いこと; (iii) 動物用動物に導入される複製遺伝子は、動物及び動物のビーム及び複製蛋白質の産生に有害な副作用を与えないこと; 及び(iv) 肝臓に分布する複製遺伝子は、出現を限り、目的する遺伝子及びそれに隣接する調節遺伝子に作用すべきであること、である。上記(ii)は特に重要であり、通常の動物用動物の血清蛋白質、即ちゾロが添加された血清蛋白質に前イオンなどの毒性物質を添加することは望ましくなくまた無効でない。前イオンを添加する場合に、工用コラーゲン、第1の複製無動物であるゲルマニオの量に有害で解毒し得ない効果を与えることになる。上記(iii)に拠しては、複製遺伝子の修正された動物は、組換えプラスミドのベクター由来の配列部分に相応する配列などの余分な DNA 配列を有してはいないのが望ましい。

本発明者の出願であつて EP-A-251744 として公開された特許書には、目的する DNA 配列を含有する相同性2 *am* プラスミド DNA 配列の2つのローターが同じ方向性を有しているインデグレートベクターを構築し、このベクターで動物を形成組換え、次いで得られる形成組換え動物から、目的とする DNA 配列が導き出されて修正された内因性2 *am* プラスミドを維持する

断片を連結することによって、内添物 2 μm プラスミ
ド DNA を目的とする遺伝子又はタンパク質のコードする DNA
配列を導入して、宿主細胞を感染する方法が記載されてい
る。インテグレートバクターは単独に、細菌と動物
細胞系中で使用できない。宿細胞 2 μm プラスミド DNA
配列は、通常それだけではないが、2 μm プラスミド既
有細胞内に存在するのである。

培養期後は、培養された2 mm プラスミドを導入することによって酵母細胞を形質転換することの出来る、

本発明の方法では、使用するプラスミドベクターは2つの同じ方向性で有している相同性2 cm プラスミド DNA (FLP) 交換能細胞の間に導入されているベクター中でベクターの増殖を可能にする DNA 配列、即ちその複製発現又はペグドをコードする DNA 配列であつて必ずしも必要ではないが好ましくは離れるに非ず相補的な DNA 配列、及び好ましくは選択性マーカー DNA 配列を含むベクターである。本発明は 2 cm プラスミド DNA 配列、FLP 配列、又は部位のうちのどれを有しており、その1列は同じ方向性を有しており、他の2列は逆の方向性を有している。このような相補性を使用するプラスミドベクターで宿主を形成可能なとき、ベクター中のベクターの増殖を可能にする DNA 配列は自然に失われ、プラスミド DNA は、形成能細胞の内部に2 cm プラスミドと置換し、同様な方法でベクターを

となる。この種のグラムミドベクターを以後グアイニ
ンテグレイションベクターという。このようなベク
ターで形質転換された菌は、目的とする遺伝子を含み
バクテリア素因は含まない第2段階グラムミドの形
容の菌を母細胞を有しており、これらは非選択的
生育条件下において選択的に安定に継承されること
が認められている。

1986年秋の第15回目の「熱帯気象学及び分子生物學」についてのコンファレンスで、Bruciniは、2M-虫媒プラスミドの感染光によってバクテリアが感染が検査されることを報告したが、それは、その系がDNAの構造と塩基との関係を研究するために用いることができることを示唆したにすぎない。米農研からは、同様の点が、予知せぬ安定性をもつる有別な発現バクテリアの構築に用いることができることを見出し、

本稿通篇で用いる「FLP 超換元群位」とは、FLP 遺伝子生産物との相互作用の領域、超換元可能な部位のいずれをも表徴する。もし Andrew らの知見(1986)が正しいならば、FLP 超換元群位は、通常低頻度によって同定された Δb 配列をその差込配列として有している。実際は、全反復配列の 99% 超換対以上を占めていたとしても何人もの株を要する。

[illegible]

異相には、区別とする遺伝子はみづからの系統を推定
 してあつてもよく、また御印と別して異體のものでも
 同様のものでもよい。本図例のダイスインクグレイシ
 ロンベクターは向太、発露期毎細胞でMet⁺-HSA 遺伝
 子を安定にインクグレイトするの用にあらうが、さ
 らこの遺伝子は、別なR⁺ベクターに14719301を明細

書に記された点に就てはホムホドリセレートキャ
ープロモーター（PQC）に、あるいは別表4の
P-Q-A-N = 2 5 3 1 2 5 9 号明細書に記されたOAL /
CYC 1 ハイドリッドプロモーターあるいはP-Q-A-N
= 2 5 3 0 6 7 号明細書に記されたOAL / PQC プ
ロモーターなどの構成要素プロモーターによつて實現さ
れる。

乳児菌の系によつて宿主に特化される特徴的な遺伝子は、例えば、腸部菌群中で細胞外グルコナーゼや酵素の産生を規定する *Saccharonophus dissimulans* の *DEX1* 1 遺伝子、炭水化物菌群でのエンド-1, 2-1, 4- β -グルコナーゼの産生を規定する *Bacillus subtilis* の β -グルコナーゼ遺伝子 (*Hinscheffel & Fox, 1968*) などである。このような遺伝子は、遺伝子の発現をコントロールし及び/又は遺伝子によつて決定される菌体機能が発現用菌群から分離されるように、最初に変異自己に相当するところである。

不発射の誤しはグライシンタグリシヨンベクター
は、ミラー・201123.9号特許権に抵触された工
程に用いるのが術に有利である。なぜなら、この工程
によれば、目的とする遺伝子はヒールの発露の間は発
現されずまた母型と異なる無作為条件下でも発現されず、
発射後の工程で発現の異常条件で発現するといふため
である。従つて、目的とする遺伝子の高レベル発現の

所阻と、細胞増殖によって細胞のサイエツトが急激な式と増殖とが分断されており、これによって、プラスミド安定性に基づき遺伝子発現の感度性を減少にすることが出来る。

本発明のベクターは、(i)パタリリア遺伝子でこの当該ベクターの増殖に必要なパタリリアプラスミドDNA配列；(ii)エキモストラ2ndFLP置換部位；(iii)目的とする遺伝子又はペプチドをコードするDNA配列；及び(iv)他の形質転換作用の選択マーカーDNA配列を有する完全2ndFLPプラスミドを含むダイスインテグレーションベクター（複製能力の速さ）であって、2ndFLPプラスミドの2つの異なる複製配列の1つの配列内の制限酵素座位に隣接パタリリアプラスミドDNA配列が導入した後はエキモストラ2ndFLP置換部位が作用されて、該置換部位と該置換方向複製配列の1つの配列内の内因性FLP置換部位とに別して同じ方向性を有して該エキモストラFLP置換部位が作用しており、該エキモストラFLP置換部位と該置換方向複製配列の1つの配列内の内因性FLP置換部位との間に隣接パタリリアプラスミドDNA配列がはさまれているダイスインテグレーションベクターが好ましい。

このような本発明の好ましいダイスインテグレーションベクターは、1つもしくはそれ以上のパタリリアプラスミドDNA配列と、2ndFLPプラスミドから得られる74塩基対FLP置換部位のエキモストラコピーとが

挿入された完全2ndFLPプラスミドからなる。更に、形質転換作用の選択マーカー例えばCOP-1と共に関与した遺伝子とすることを選択し、2ndFLPプラスミドの第2の部位に挿入されている。パタリリアプラスミドDNA配列と他のDNA置換部位とが、完全2ndFLPプラスミドの2つの異なる複製配列の1つのコピー内の間隔に200-1000塩基対挿入されている。DNA置換配列の正しい方向は、プラスミドの断片に必須であり、例えばE. coliでの増殖に必要なパタリリアプラスミド配列は、2ndFLPプラスミドのFLP置換部位の同じ方向性を有する2つのコピーの間隔には含まれるようにプラスミドが増殖される。DNA配列の位置は、例3図に示して説明されている。このように複製することによって、プラスミドを断片に挿入した時に2つの同じ方向性を有するDNA置換配列の間で正しい位置で最初挿入され、プラスミドから抜かれるようにDNAの領域内、パタリリアプラスミドDNA配列を配置することが出来る。この部位特異的領域は、2ndFLPプラスミドのFLP置換部位と隣接することによって、この領域は、cis⁺細胞を形質転換した場合は細胞の内因性2ndFLPプラスミドによって供給され、cis⁻細胞を形質転換した場合にはダイスインテグレーションベクター自身によって供給される。本発明のベクターは、形質転換細胞の内因性2ndFLPプラスミドを補うように使用することができ、また増殖はcis⁻細胞の方が速く起こる

ことから、本発明のベクターは完全2ndFLPプラスミドに近づくのが好ましい。しかしながら、本発明のベクターが内因性2ndFLPプラスミドと異なする場合に、隣接パターンのないREP 2, REP 3, FLPなどの遺伝子は、これらの遺伝子の産物であるトリグロ作用産物として供給される。これらのすべては複製のオリゴンに必要なのである。

以下に詳述するように、パタリリアDNA配列を有する挿入前DNA配列は、そのそれぞれの來源の複製配列のそれぞれの部分を保持してよく、この場合とは挿入前DNA配列は、内因性置換部位が破壊されて付いた2つおしFLP置換部位が形成されるように内因性複製配列内に挿入され、このFLP置換部位はそれぞれ内因性置換部位と挿入された挿入前DNAの相補性部分とからなっている。あるいはまた、完全なFLP置換部位を挿入用DNA配列の一部に導入し、次に得られるDNA配列を、パタリリアDNA配列が内因性複製配列と挿入用複製配列とに間に存在するように、内因性複製配列に隣接して又は別れて挿入される。挿入前DNA配列が、内因性複製配列から離れた位置に挿入される場合には、内因性複製配列と挿入された複製DNA配列との間の内因性DNA配列はパタリリアDNA配列とともに破壊される。従ってこのDNA配列が必要な場合に、挿入用複製配列の内因性複製配列から離れた所に好ましくは挿入されるDNA配列上を

置けるDNA配列の1つのコピーを置く必要がある。

目的とする遺伝子を挿入するインテグレート2ndFLPプラスミドの部位は、破壊によるプラスミドコピー数及び複製の安定性への効果が最小になるように選択される。従って、REP 1, REP 2, REP 3及びFLP遺伝子に対して害を及ぼさないような部位に目的とする遺伝子を挿入するのが好ましく、特に、プラスミドを形成するcis⁺細胞の形質転換に用いる場合にはそのようにすることが好ましい。

本発明のダイスインテグレーションベクターの1つの別例を明記すれば、それをcis⁺細胞に導入した場合にそれがインテグレート2ndFLPプラスミドを有しているためにパタリリアプラスミド配列が除去される場合または除去された後にそれが内因性2ndFLPプラスミドを補うことができることである。同様の状況については他のcis⁺宿主細胞に導入された完全2ndFLPベクターについても毎年されている（Harford & Peters, 1987）。本発明のダイスインテグレーションベクターは、置換後の内因性2ndFLPプラスミドを補うために用いることもできる。

図1に示した図面においては以下のことが示されている。

図1図は、プラスミドpBA112（Anderson, et al., 1985）を示す。唯一の鍵は、パタリリアプラスミドpUC9から導き出されたDNA配列を示し、太い黒線の内は、FLP置換部位を含む74塩基対パタリリアプラスミド

ントを示し、三角形は、それぞれのPLP結合部位内の
の3つの内部DNA反復配列の方向を示す(Andrews,
et al., 1985)。

第2図は、プラスミドpSAC 112を示す。プラスミドpSAC 112は、*Bam* III、*Pst* I及び*Hind* III部位が位置されている以外はpSAC 112と同じである。

第3図は、プラスミドpSAC 3を示す。太い線は、バクテリアプラスミドpUC 9のDNA配列を示し、太い塊状の塊は、PLP結合部位を含む4基座のDNAフラグメントを示し、細い線は2本プラスミドDNA配列を示し、三角形は、それぞれのPLP結合部位内の3つの内部DNA反復配列の方向を示す。

第4図は、プラスミドpSAC 3U1を示し、番号は第3図と同じである。

第5図は、pSAC 3U2のプラスミドマップを示し、番号は第3図と同じである。

第6図は、pSAC 3U3のプラスミドマップを示し、番号は第3図と同じである。

第7図は、pSAC 3U4のプラスミドマップを示し、番号は第3図と同じである。

第8図は、pSAC 3C1のプラスミドマップを示し、番号は第3図と同じである。

第9図は、単体遺伝子の生育を示す基質に因った位置であり、URA 3及びバクテリア λ 噬菌体の遺伝子の位置を示す。

Xba Iで開設したpSAC 112に連結した。連結して得られるDNAをE. coli株AG 1 (NBL Bioreagents Ltd., Crawley, England)から入手した)に導入した。得られるアンピシリン耐性の形質転換体について、プラスミドpST 92 (Storke, R.W., et al., 1977)から得た³²Pラベル化2.2 kbの細菌的Eco RIフラグメントとのコロニーハイブリダイゼーションによる (Oranstein & Hogness, 1975)、2本プラスミドに対する相同性をスクリーニングした。2本プラスミドに特異的なDNAプロベに対して検出性を示すコロニーを単離し、そのプラスミドDNAを制限酵素マゼンジンにより消化を行った。かくしてプラスミドpSAC 3を得た。

プラスミドpSAC 3を制限酵素Pst Iで開設することによって、プラスミドpSAC 3U1 (第4図)及びpSAC 3U2 (第5図)を構築した。宿主DNAを、0.3 M dGTP (dATP, dTTP, dCTP及びdGTP)の存在下で70°Cで10分間、T₄ DNAポリメラーゼで標識してグラントに添加した。DNAをエタノールで抽出し、リガーシオンを行なう前にエタノール沈殿させた。プラスミドpST 92 (Storke, 1977)を、制限酵素Hind IIIで消化し、DNAフラグメントを1 kbのサイズのゲルで電気泳動した。泳動のURA 3遺伝子を持つ1.1 kbの宿主DNAフラグメントをゲルから単離し (Kaufman, et al.,

第10図に、³²Pでラベル化したpSAC 3 DNAでプロベした標準DNAのオートラジオグラフィを示す。

以下に、本発明を例として説明する。

実施例1

プラスミドの構築

プラスミドpSAC 112 (第1図, Andrews, et al., 1985)を、制限酵素Bam III及びHind IIIで同時に消化することによってプラスミドpSAC 112 (第2図)を構築した。宿主プラスミドDNAを、0.3 M dGTP (dATP, dTTP, dCTP, 及びdGTP)の存在下で70°Cで10分間、DNAポリメラーゼ (タケノコ)で標識した。DNAをエタノールで抽出し、リガーシオンを行なう前にエタノール沈殿し、次いでDNAをRNAリガーゼの存在下で15°Cで1時間インキュベートした。連結されたDNAをE. coli株MC 1061 (Caedeban & Cohen, 1975)に導入し、得られる形質転換体からプラスミドpSAC 112を単離し、Birchbois & Doly (1980)の方法によって所望した形質転換体を選別した。

以下のようにしてプラスミドpSAC 3 (第3図)を構築した。Overlander, et al. (1974)に記載された方法と同様にしてEco RIから、第2本プラスミドDNAを単離した。構築した2本のプラスミドDNAを、Mazletti, et al. (1982)に記載された方法と同様にして、制限酵素Xba Iで部分消化し、

1982)、0.3 M dGTP (dATP, dTTP, dCTP, 及びdGTP)の存在下でDNAポリメラーゼ (タケノコ)で標識した。1.1 kbの宿主DNAフラグメントをエタノールで抽出し、リガーシオンを行なう前にエタノール沈殿し、次いでDNAをRNAリガーゼの存在下で15°Cで1時間インキュベートした。連結されたDNAをE. coli株MC 1061に導入した。得られる形質転換体について、プラスミドpST 92 (Storke, 1977)から得られる1.1 kbの宿主DNAフラグメントを、pSAC 3のユニークなコロニーハイブリダイゼーションによる (Oranstein & Hogness, 1975)、URA 3遺伝子に対する相同性をスクリーニングした。URA 3遺伝子プロベに対して検出性を示すコロニーから、プラスミドpSAC 3U1 (第4図)及びpSAC 3U2 (第5図)を単離した。また、URA 3遺伝子を含む1.1 kbの宿主DNAフラグメントを、pSAC 3のユニークなBam III部位及びBam III部位にグラントに連結して、pSAC 3U3 (第6図)及びpSAC 3U4 (第7図)と命名されたプラスミドを得た。

プラスミドpST 92 (Storke, 1977)を、制限酵素Xba I (第8図)で部分消化し、0.3 M dGTP (dATP, dTTP, dCTP, 及びdGTP)の存在下で70°Cで10分間、T₄ DNAポリメラーゼで標識してグラントに添加した。DNAをエタノールで抽出し、リガーシオンを行なう前にエタノール沈殿させた。プラスミドpSAC 3 (第3図)を、制限酵素Xba Iで部分消化し、得られる形質転換体からプラスミドpSAC 3C1 (第9図)を単離した。

Zusatz 1: pEAC 5 U 1 und pEAC 5 U 2による阻害
の形質発現

ダイクミンチラセリシユンベクター pSAC 3U1 (図4)及びpSAC 3U2 (第3図)は、2.3kbのフレームのユニークPstI I 部位に挿入された選択阻害剤基が URA^rとされそれを含むように構築されている。またには、それぞれのプラスミドは、同じ方向性を有するFLP-選択阻害剤2つのコピーに挟みこむことができる。プラスミドpUC9から得られるDPA1質粒を保持している。pUC 9 DNAの位置は、これらの同じ方向性を有する2つのFLP-選択阻害剤間のFLPを介しての再組み込みが、この結果、両方の複製基の間に複製バリアをプラスミドDNAが形成されるように位置にある。24 (1988)の方法に従って、プラスミドpSAC 3U1及びpSAC 3U2で、それぞれ希釈率150:2.2のcis⁺及びcis⁰株を構築し(Casbourne, et al., 1986)の形質転換してシラカム由来菌株とした。得られるURA^r形質転換株について、ChevalierとAsile (1979)の方法に従って、酵母でpシラカム特異的複製抑制剤-クダラザをコードするパタドパ bla 遺伝子の発現阻害能性をスクリーニングした。第9図中の結果が表わされている、それによれば、両者のプラスミドは、全てのcis⁰株の形質転換株においてURA^r遺伝子からbla 遺伝子と分離(segregate)しており、両者の形質転換の間に、プラスミドからパタドパ DNA配列を

図表することによって示している。しかしながら、 cis^+ 株のrDNA 系質粒溶液の大部分については、bbs 遺伝子発現阻害剤に曝露されたときと同様に阻害された。pBAC 3321 については2日のうち1株、pBAC 3322 については2日のうち1株。これらのデータから、グラム陰性の菌、即ちRFLPによるパセリチカグナムとDPA 配列の陽性株、 cis^+ 株よりも cis^- 株の形質転換の頻りにより大きく異なることが示唆される。

所製得試樣之分子分析

b1a 遺伝子と結合した URA^r 形質転換体 (即ち、 ϕ - λ CTD⁺U^r-E^r-G^r-P^r-G^r-D18^r) の DNA を、突然変異遺伝子と結合した菌質に ϕ マリファグリス菌に D18 遺伝子と失活している菌を接種するため、菌体 DNA を分別した。pBAC 3301 又は pBAC 3302 で形質転換された *cis^r* 及び *cis^r* 後の 2 つの URA^r D18^r 形質転換体で、 λ CTD⁺U^rと結合しない菌を 3 株ずつ選別して、以下に挙げる方法でその遺伝子を選出した。よく生育した菌株を選出し、それぞれ、1 mL の LB 培地、0.0-2.5 M ナトリウムアセテートと酢酸 (SPIA) 培地 0.8、8 時/100 mL スピートメントを 28°C で 1-5 分間育成した。そして、培養液を 1.2 mL の LB 培地、0.1 M 酢酸ナトリウム、0.0-5 M EDTA pH 5.8、0.0-2.5 M /Naイソギン酸 (ナトリウム、Co, Li) の溶液に 28°C で、アロブアロブで繰りかえすように選別した。培養液を 1.2

ヌクレオチド、1.2 M ヴァルニールで 10 分洗脱し、3 M ナトリウム、0.3 M トリス/HCl pH 7.5、0.2 M EDTA、100 mg/l 酵母アインザイターで 1 分洗脱し、5 分 60 分分画を蓄積した。クロマトグラム：イソブチロール、メタノール、クロロホルム、炭化水素系で DNA 酵素添加物を抽出し、1.0 ml トリス/HCl、1 mM EDTA pH 8.0 で洗脱して再精製した。再精製 DNA を、制限酵素 *Xba*I、*Xba*I 及び *Pst*I で消化し、得られた DNA フラグメントをアガロース凝縮剤中で分画した。サブクランニング (Maniatis et al., 1982) に従い、両面 DNA 転写を行うための pBR32 DNA をハイブリッドさせた。その結果は図 1 0 面に示されている。第 1 0 図は、32P ラベル化 pBR32 DNA でプロブされた両面 DNA の 0.5% のアガロースゲルに示している。プラスミド pBR32 U1 又は pBR32 U2 で標置転写された 5' 5'-2' 及び 3' 5'-2' の割合を算出した。これは元の転写/プラスミドの割合の 2 分の 3 の割合であった。B にも適用し、それらを示した。DNA は元の 2 分の 1 に相対濃度で消化した。

$\text{Kb}1 : \text{トランク} 1 \times 4 \text{ 及び } 21 \times 24$
 $\text{Fet}1 : \text{トランク} 6 \times 12$
 $\text{Kc}21 : \text{トランク} 13 \times 20$

トランプ	プラニティ	95% ¹⁾ /910 ²⁾	海程(人/月)
0. 1. 4. 2. 2	p8AC3U1	017*	A
8. 1. 6. 2. 4	p8AC3U1	017*	B
5. 1. 5. 2. 1	p8AC3U1	018 ⁰	A
7. 1. 5. 2. 3	p8AC3U1	018 ⁰	B
2. 1. 0. 1. 8	p8AC3U2	017*	A
4. 1. 2. 2. 0	p8AC3U2	017*	B
1. 9. 1. 7	p8AC3U2	017*	A
3. 1. 1. 1. 9	p8AC3U2	017 ⁰	B

図5の内図は2.46ブラスミッドに存在する公同の創
痕素素部(Bartley & Donelson, 1980)及び
決えブラスミッドpBAC21及びpBAC3に2.46ブラスミッド
ブラスミッドpBAC3に別するハイブリダイゼーション
パターンを予想するものが出来る。予想されるハイ
ブリダイゼーションパターンを表1に示した。

表 1

pSAC501 及び pSAC502 で遺伝転換された S150・250citr ⁺ 及び cit ⁻ 菌株後継の pSAC5 に対する平均ハイブリダイゼーション	制限酵素消化フラグメント (kb 単位)	
	EcoRI	EcoRV
プラスミド pSAC5	4.1 4.9 2.4 2.2	3.2 3.1
pSAC501 及び pSAC502 (citr ⁺)	5.5 4.1 0.72	4.5 3.2 2.8
pSAC501 及び pSAC502 (citr ⁻)	(5.0) 4.1 2.5 (2.4)	4.5 3.2

全ての株において、それらの制限酶が失われていることが観察された。即ち、pSAC300 及び pSAC510 は酵母の形質転換の際にパタリブアプター-DNA を除去することができ、その点に照して、プラスミド pSAC500 の場合とは、S150・250 の cit⁺ 菌株後継の bla^r 形質転換剤が有罪に無い点で違いとが観察された。このことについてはどのように説明すべきかは判らない。しかしながら、次の可能性がある。即ち、pSAC500 は URA^r 遺伝子が挿入されたことにより bla^r (1) 遺伝子が失われ、喪失している FLP 遺伝子の発現が阻害を受け、その結果 FLP レジニホナーゼの活性が低くなった可能性がある。

プラスミド pSAC501 を、顕形変性薬剤治療、芽胞発酵酵母の形質転換に用いることを示した。即ち、Hirokawa と Deubney (1986) に記載されている Base ライター-ビール酸塩 Na⁺ 1.0 を pSAC501 で形質転換した。続いて、得られる細胞形質転換体について、タウタマーゼプレートアッセイによる bla^r 形質転換が確認するが言がセミアシした。テストした形質転換体の約 1/8 が bla^r-細胞低発を示し、そのことは、発酵用酵母株においてプラスミド pSAC501 の *in vivo* 分解が起きたことを示している。

プラスミド pSAC300、pSAC510 及び pSAC501 の *in vivo* 分解について、形質転換が失われた菌と菌の分子上の制限付加を分析行なうことにより分

析可能とした結果は、分離したプラスミドが FLP による内部消化を受けた場合に出るフラグメントを示すものである。

ハイブリダイゼーションの結果 (図 10 図) とその予想 (表 1) とを比較すると、それぞれの形質転換体において、同じ方向を有する FLP 認識位点間内にあるパタリブアプター-DNA 配列の除去に起因する欠失を認識するプラスミドが受け付けたことが判る。更には、pSAC302 (3) と前述された形質転換体の場合とは、S150・250 株の内約 2% がプラスミドはもはや存在していない。このことは、プラスミド pSAC302 で cit⁺ が形質転換されることにより内部低 2% プラスミドが除去されたことを示している。

更に、プラスミド pSAC501 と pSAC502 が酵母の形質転換の際にパタリブアプター-DNA 配列の除去を受けたことは、³²P-ラベル化 pTOP-DNA (Viviera と Weissberg, 1982) に対応する上記した DNA 転換剤のハイブリダイゼーションからも明らかである。URA^r c1a⁺ 形質転換剤は、この DNA アプター配列でハイブリダイズしたかった。

酵母形質転換の際のプラスミド pSAC500、pSAC510 及び pSAC1 の分離

URA^r プラスミド pSAC500 及び pSAC510 を用いて、S150・250 の cit⁺ 及び cit⁻ 菌株後継を形質転換し、得られる形質転換体の DNA 及び bla^r 形質転換剤を調べた。

例が示していることを確認した。即ち、上記した ³²P-pTOP-DNA に対して酵母 DNA をハイブリダイズさせた際、bla^r 菌種株に対しては得られた相同性も検出されなかった。

"分離"形質転換体のプラスミドの分析

pSAC501、pSAC502、pSAC500 及び pSAC510 の分離されたプラスミド酵母株を含有する S150・250 の cit⁺ 及び cit⁻ 菌株における URA^r 形質転換の制限酵素検査、2 重 W/ハルローズを含む YPD 中で形質転換体酵母を生産せしめ、同じ条件下にプレートし、灰いでタウタマーゼ欠いた菌と増加した菌をプレートすることによって調べた。1 世代目のプラスミド欠失パーセントを計算し、表 2 に示した。

表 2

1 世代目のプラスミド欠失パーセント

プラスミド形質転換 (分離されたパタリブ)	1 世代目のプラスミド欠失パーセント (分離されたパタリブ)	
	S150・250 cit ⁺	S150・250 cit ⁻
pSAC501	0.22	0.19
pSAC502	0.31	0.14
pSAC500	2.5	-
pSAC510	0	0.89

図2の結果から得るよ様に、すべての分離された (プイミンテグレートされた) ペグマータは、 $8150-2$ B の *cis*⁺ 及び *cis*⁻ 誘導体群中では不安定である。しかしながら、特に pSAC301、pSAC302 及び pSAC310 の不安定性のレベルは、 $8150-2$ B 群中の他の URA⁺ 2 個由来誘導体ペグマータ (Coaductors, *et al.*, 1984) よりも少なくともワンオーダー低い。

pSAC3 の 2 個のプラスミド部分のモーター *Sae* I 断片は URA⁺ 誘導体を導入するに必要として、pSAC301、pSAC302 及び pSAC310 から誘導される分離されたプラスミド誘導体よりも安定性が低い分離されたプラスミド誘導体が得られることは証明される。従って、選択マーカーの導入阻害が、得られる分離されたプラスミド誘導体の安定性に対して大きな影響を与えることが明らかである。この点に關して、2 個のプラスミドのモーター *Sae* B 及び *Pst* I 断片が誘導体導入の導入に選した遺伝子形成することが明らかである。何故なら、このより高阻害への導入によるプラスミドの安定性が他を凌駕しているからである。

阻害阻害型の「分離」形質転換型でのプラスミド型
発現

SB 1.0 の pSAC301 形質転換体の分離されたプラスミド誘導体を有する分離形質転換体について、誘導体誘導体の安定性を調べた。上記したと同様にしてプ

ラスミド安定性の実験を行った。誘導体の誘導条件下で 1 世代当たり 0.014% のプラスミド欠損が観察された。この結果から、pSAC301 の分離されたプラスミド誘導体は誘導体誘導体 SB 1.0 中で非常に安定であり、追加の 2 個の形質転換ペグマータについてこれと同等な結果を得たことをこの阻害阻害型を示している。

誘導体中で目的とする遺伝子を安定に維持するために
ガイジンテグレートコンプレックスを形成すること
ができる

プラスミド pSAC3 はモーター *Pst* I 断片及びモーター *Sae* B 断片を有しており、これらにより DNA 配列を導入しても、宿主でのプラスミドの形質転換の誘導体の安定性に対して悪い影響を及ぼさなく、DNA 配列を導入することができる。これらの断片は、目的とする遺伝子、例えば、*discontinuous* の DEX-1 遺伝子及び誘導ペグマータで誘導されるヒト遺伝子 *plg* の導入のための遺伝子断片として用いることができる。この方法を用いて、断片形成体の誘導マーカーをともにこのように誘導体をこのようにモーター誘導体導入することができる。あるいは、プラスミド pSAC301、pSAC302、pSAC310 及び pSAC301 は、目的とする遺伝子を導入するための阻害体として用いることができる。この点に關しては、プラスミド pSAC301、pSAC302 及び pSAC310 は、URA⁺ 誘導体の 5'-誘導体阻害モーター *Sae* I 断片を有し

ている (Rose *et al.*, 1984)。この *Sae* I 断片は、適切な目的とする遺伝子を導入するための遺伝子断片として用いることができる。

目的とする遺伝子を阻害的にあるいは阻害的に導入するため (例えば URA⁺ 誘導体を導入し、次いでその *Sae* I 断片に目的とする遺伝子を導入するような場合) *Sae* B I 断片を用いることが望ましいが、ペグマータの形質転換に必要である。別々、ペグマータ DNA 配列の形質転換について、このことが本発明の他の 1 つの局面を形成している。一般に、導入された遺伝子から内臓 2 個、物理断片の阻害オリゴ (*ori*) から離れた *Sae* B I 断片の DNA 断片まで断片が行われるのを止めるのが望ましい。従って、導入される配列は、(a) 目的とする遺伝子、(b) その *ori* の阻害オリゴ断片上にあるプロモーター及び (c) 目的とする遺伝子の下流であつて止つた目的とする遺伝子と *STB* 断片との間にある 5'-阻害オリゴ断片からなるのが好ましい。

引用文献

- Aizle *et al.*, (1984), *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **42**, 1.
Andrews *et al.*, (1985) *Cell*, **41**, 795.
Boggs, (1978), *Nature*, **275**, 104.

- Boggs, (1981), in: "Molecular Genetics in Yeast" Alfred Benzon Symposium No. 10, Munksgaard, Copenhagen.
Birnboim & Doly, (1980), *Nucleic Acids Research*, **2**, 1513.
Boltvar, (1978), *Gene*, **4**, 121.
Sussman & Davis, (1982), in "The Molecular Biology of the Yeast, *Saccharomyces* Metabolism and Gene Expression", Eds. Strathern *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
Froch & Hicks, (1980), *Cell*, **21**, 501.
Casadaban & Cohen, (1980), *Journal of Molecular Biology*, **122**, 179.
Cashmore, *et al.*, (1986), *Molecular and General Genetics*, **205**, 154.
Chevallier & Aigle, (1979), *Yeast Letters*, **105**, 179.
Chevallier, *et al.*, (1980), *Omnis*, **11**, 11.
Clarke & Carbon, (1980), *Nature*, **287**, 504.

- Clark-Walker & Miklos, (1974), European Journal of Biochemistry, 41, 359.
- Cohen et al., (1980), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 77, 1078.
- Falco & Dames, (1985), Genetics, 109, 21.
- Fischer, (1986), Journal of Theoretical Biology, 119, 197.
- Fischer & Cox, (1988), Journal of Bacteriology, 154, 612.
- Garboud et al., (1979), Gene, 5, 233.
- Gritz et al., (1983), Gene, 25, 178.
- Grinstein & Hogness, (1975), Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 72, 5961.
- Guarino, et al., (1974), Biochemical Biophysics Research Communications, 61, 462.
- Hadfield, et al., (1984), Gene, 45, 149.
- Hartford & Ostry, (1985), OMA, 4, 80.
- Hartford & Peters, (1987), Current Genetics, 11, 318.
- Kingsman, et al., (1985), Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 3, 377.
- Livingston, (1977), Genetics, 86, 73.
- Livingston & Habbe, (1979), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 3727.
- Mantel et al., (1982), In: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour, New York.
- Murray et al., (1987), The EMBO Journal, 6, 4205.
- Nelson & Pangman, (1979), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 6515.
- Newton, et al., (1981), ICM-UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology, 29, 501.
- Orr-Weaver, et al., (1981), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 78, 6534.
- Orr-Weaver, et al., (1985), In "Methods in Enzymology", Ed. Wm. et al., 101, 228. Academic Press, New York.
- Rine, et al., (1983), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 80, 4750.
- Rose et al., (1984), Gene, 29, 153.
- Roberts, (1983), In "Methods in Enzymology", Ed. Wm. et al., 101, 207. Academic Press, New York.
- Selig et al., (1980), Nucleic Acids Research, 8, 3371.
- Sigurdson et al., (1981), Molecular and General Genetics, 183, 59.
- Song et al., (1988), Cell, 52, 27.
- Storm, et al., (1979), Journal of Bacteriology, 140, 73.
- Struhl et al., (1979), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 1035.
- Takeo et al., (1980), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 77, 3144.
- Tubb, (1980), Journal of the Institute of Brewing, 86, 78.
- Vieria & Kensing, (1982), Gene, 16, 259.

Volkmann & Broach, (1986), *Cell*, **46**, 541.

Volkmann & Broach, (1987), *In Press*.

Walmsley, *et al.*, (1985), *Molecular and General Genetics*, **192**, 361.

Wehster & Dickson, (1983), *Gene*, **26**, 243.

Winston, *et al.*, (1985), In "Methods in Enzymology", Eds. Wn. *et al.*, **101**, 211.

Wu, *et al.*, (1985), In "UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology: Yeast Cell Biology", Ed. Hieto, **23**.

Yocum, (1985), 欧州特許出願 No. 163491.

組換え体においては、同じ方向を示す2つのPstI 経路を有すること、希望しない例えはそれらの間にあるベクターDNA (例えば組換え体のベクターによって形成されたプラスミドの2つの部分の短い配列として) とを有するプラスミドを複製してもよい。組換え体は、このようなプラスミドは1つの組換え体経路を有し、従って通常の2つの組換え体経路を有する、AとBの組換え体経路とされない。このようなプラスミドは止めたプラスミドよりも不安定であるが、本発明の1局面を形成しそのものもクローンされる。

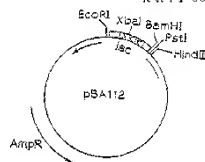


Fig. 1

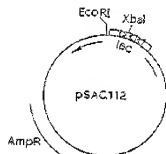


Fig. 2

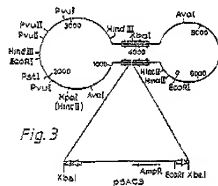


Fig. 3

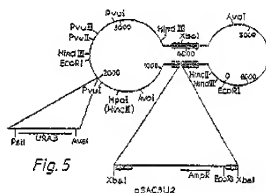


Fig. 5

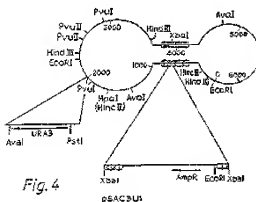


Fig. 4

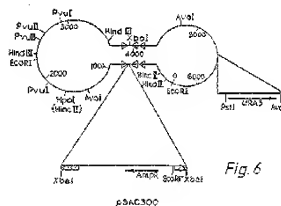


Fig. 6

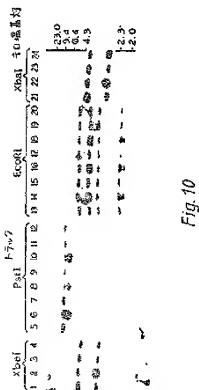
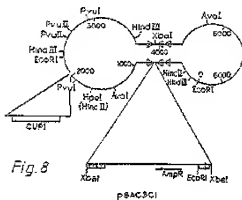
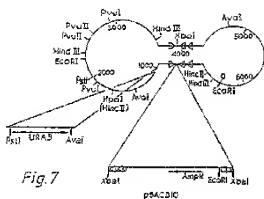
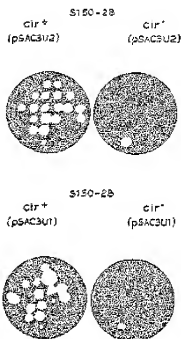


Fig. 9 URA⁺及び bla^r の遺伝的継承

[illegible]

Planet name and right of triangle sign	Triangular area	Planet binary numbers?	Perigee date
12-Ap 02012-29	12-11-76	G8-A-1 21712206 J10-A-6 61212053	01-12-78 12-12-80
10-Ap 070500A	21-05-87	J10-A-6 64444536 G9-A-3 67244243	01-11-82 02-06-83
12-Ap 01471-50	05-07-85	AL-A-2 17061124 J10-A-6 05706162	24-07-85 29-12-86

[illegible]

第1章 概要

優先權主張

⑤1987年8月3日⑥イギリス(GB)⑦08718347

發明者

チネリイ、シモン アンドリュ イギリス国 エヌジ-13 8イーディー、ノッティンガムシャー、
ー ビンガム、マスターズ ロード、4